

顽痹清丸质量标准提高

杜天信^{1,2}, 罗石任*, 杜志谦^{1,2}, 李洁², 张毅², 王秀真²

(1. 河南正骨研究院, 河南 洛阳 471000; 2. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 提高顽痹清丸的质量标准体系。方法: 采用薄层色谱法对方中紫草、吴茱萸、土茯苓进行定性鉴别研究; 采用高效液相色谱法对忍冬藤进行含量测定研究。结果: 薄层色谱斑点清晰, 阴性对照无干扰; 马钱苷在 0.013 4~0.080 4 g·L⁻¹ 呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 8$); 平均加样回收率为 97.07%, RSD 1.24%。结论: 建立的薄层色谱法和高效液相色谱法专属性强、准确度高、重复性好, 可用于顽痹清丸的质量控制。

[关键词] 顽痹清丸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 马钱苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0112-03

Studies on Improving Control Standard of Wan Bi Qing Pill

DU Tian-xin^{1,2}, LUO Shi-ren^{2*}, DU Zhi-qian^{1,2}, LI Jie², ZHANG Yi², WANG Xiu-zhen²

(1. Henan Orthopedics and Traumatology Institute, Luoyang 471000, China;

2. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To improve the quality standard of Wanbiqing Pill. **Method:** The TLC method was used to identify *Arnebiae Radix*, *Euodiae Fructus* and *Smilacis Glabrae Rhizoma*. The HPLC method was used to detect the content of loganin in *Lonicerae japonicae* caulis. **Result:** This TLC method is good in separation, strong in specificity and negative in interference. Loganin was detected in the range of 0.013 4-0.080 4 g·L⁻¹, indicating good linear relationship ($r=0.999\ 8$). The mean sample recovery rate was 97.07% and the RSD was 1.24%. **Conclusion:** The TLC and HPLC methods are simple and accurate in operation, high precision and good in reproducibility, and they can be taken as the standard of quality control for Wanbiqing Pill.

[Key words] Wanbiqing Pill; TLC; HPLC; loganin

顽痹清丸为河南省洛阳正骨医院制剂, 为浓缩丸, 属于平乐正骨传统药物, 由忍冬藤、络石藤、黄芩等十余味药物组成, 适用于风湿热痹阻经络所致

的现行质量标准体系, 使该制剂具有更加完善可靠的质量标准, 保证临床用药的安全有效性。

1 仪器与试剂

Agilent-1100 型高效液相色谱仪, DAD 检测器, Agilent 化学工作站, Agilent C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), XS205DU 型电子天平 (梅特勒-托利多有限公司), ZF-7 型三用紫外分析仪, DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱。

马钱苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 111640-201005), 顽痹清丸 (批号 20101109, 20101220, 20110105), 购自河南省正骨研究所, 试剂乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂为分析纯。

2 薄层鉴别

2.1 紫草 取本品 20.0 g, 研细, 加石油醚 (60~90) 50 mL, 超声处理 20 min, 用 2% 氢氧化钠溶液 30 mL 振摇提取, 弃去石油醚层, 水液加盐酸调至溶

[收稿日期] 20120802(014)

[第一作者] 杜天信, 学士, 研究员, 从事中药复方制剂的质量研究、中药有效成分的分析与测定。Tel: 13937913221, E-mail:

[通讯作者] * 罗石任, 硕士研究生, Tel: 13523486589, E-mail: luoshihren047@126.com

液略显红色,再加乙醚 30 mL 振摇提取,分取提取液,挥至近干,残渣加乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取紫草对照药材 1.0 g,同法制成对照药材溶液。再取缺紫草阴性制剂 20.0 g,同法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取供试品溶液 20 μ L,对照药材溶液 8 μ L,阴性溶液 20 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-甲酸(8.5:1.5:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同的紫红色斑点;再喷以 10% 氢氧化钾甲醇溶液,斑点变为蓝色。阴性对照无干扰。

2.2 吴茱萸 取本品 6.0 g,研细,加甲醇 30 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液,取吴茱萸对照药材 0.25 g,同法制成对照药材溶液,另取缺吴茱萸阴性制剂 6.0 g,同法制成阴性对照液,照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取上述 3 种溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-丁酮甲酸-水(5:3:0.5:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干。置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。

2.3 土茯苓 取本品 12.0 g,研细,加甲醇 20 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取不含土茯苓的本方制剂,同法制得缺土茯苓的阴性样品溶液。再取土茯苓对照药材 2.0 g,同法制得对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取上述 3 种溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯(8:2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。

3 含量测定

3.1 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),柱温 30 $^{\circ}$ C,流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(12:88),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长 236 nm,进样量 20 μ L。

3.2 溶液的制备

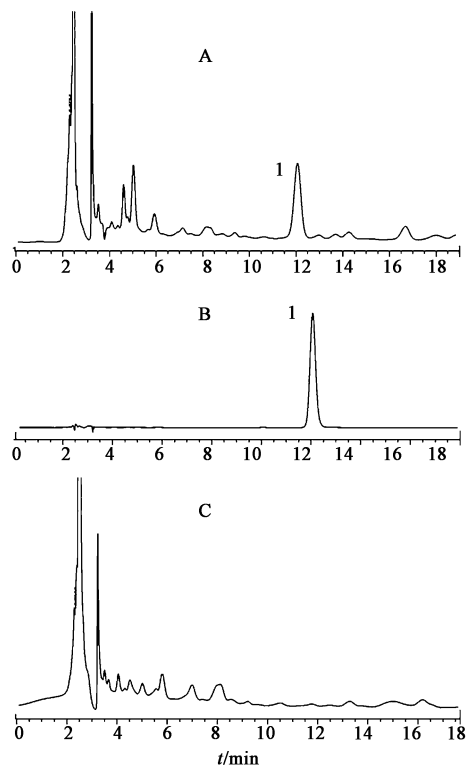
3.2.1 对照品溶液 取马钱苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 40.50 μ g 的溶液,即得。

3.2.2 供试品溶液 取本品适量,研细,取约 2 g,

精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 30 mL,称定质量,超声处理 30 min(功率 250 W,频率 33 kHz),放至室温,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

3.2.3 阴性溶液的制备 按处方比例和制备工艺制成缺忍冬藤的阴性样品,按 3.2.2 项下方法操作,制成缺忍冬藤的阴性溶液。

3.3 专属性实验 分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液及阴性样品溶液各 20 μ L,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定。阴性样品在马钱苷的保留时间无干扰峰。结果见图 1。



A. 供试品; B. 对照品; C. 阴性样品; 1. 马钱苷

图 1 顽痹清丸 HPLC

3.4 线性关系考察 取马钱苷对照品对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含马钱苷 0.134 mg 的溶液,精密量取上述溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL 分别置于 1 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,分别进样 20 μ L,以样品浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),马钱苷的回归方程为 $Y = 54\,436X + 11.38$ ($r = 0.9998$),马钱苷在 0.0134 ~ 0.0804 g \cdot L⁻¹ 呈良好线性关系。

3.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 20 μ L,注入色谱仪,连续进样 5 次,按上述色谱条件测定,以马钱苷平均含量计算, RSD 0.43%,表明仪器精密

度良好。

3.6 重复性试验 精密称取本品 6 份(批号为 20101220),按 3.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取各供试品溶液 20 μ L,按上述色谱条件测定。以马钱苷峰面积计算,RSD 1.50%,表明本方法重复性良好。

3.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,每 1 h 进样分析 1 次,连续测定 6 次。结果马钱苷峰面积 RSD 1.92%,表明供试品溶液在 6 h 内稳定。

3.8 加样回收试验 取已知含量的同一批号样品 6 份,精密称定,分别添加马钱苷对照品溶液(101.53 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 适量,按 3.2.2 项下供试品制备方法制备样品溶液。在所确定的 HPLC 条件下进行测定,计算回收率。结果见表 1。

表 1 顽痹清丸中马钱苷加样回收率实验

取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
2.000 1	1.043 6	1.015 3	2.033 1	97.46	97.07	1.24
2.000 3	1.043 7	1.015 3	2.021 0	96.26		
2.000 2	1.043 7	1.015 3	2.008 6	95.04		
2.000 9	1.044 0	1.015 3	2.037 8	97.89		
2.000 5	1.043 8	1.015 3	2.041 4	98.26		
2.000 9	1.044 0	1.015 3	2.033 9	97.50		

3.9 样品测定 取 3 批样品,按 3.2.2 项下的制备方法制备样品溶液,在上述色谱条件下进样分析,测定马钱苷含量,结果分别为 0.522,0.534,0.507 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

4 讨论

韩军涛关于本品的质量标准中^[1]研究了吴茱萸、牡丹皮、黄芩 3 味药的定性鉴别,缺乏含量测定项,难以保证临床用药的安全有效。因此,本文通过增加对该制剂的紫草、土茯苓的定性鉴别和对君药忍冬藤的含量测定研究,并对吴茱萸的定性鉴别方法进行优化,使该制剂具有更加完善可靠的质量标准,保证临床用药的安全有效。

紫草的定性鉴别中^[2-3],采用 2010 年版《中国药典》一部紫草单味药材项下供试品溶液的制备方法制备本样品供试液,结果背景干扰太大,用正文供试品溶液的制备方法,可有效降低背景,消除干扰,

专属性强;吴茱萸的定性鉴别中^[4],对提取方法和提取时间进行了优选,由结果得知,提取方法为超声处理 20 min,与现行质量标准中静置 30 min、超声 30 min 相比较,文中方法更为简便,且色谱图中荧光斑点更清晰,故吴茱萸的提取方法改为文中所述方法;土茯苓的鉴别中,经比较试验^[5-6],经一次展开喷以 10% 硫酸乙醇试液置紫外灯(365 nm)下观察荧光即可,阴性无干扰。

含量测定中,比较了多个流动相^[7-10],发现采用文中流动相进行洗脱,分析时间短,阴性无干扰。供试品溶液的提取时间分别考察了超声 20,30,40 min,结果表明超声 30 min 马钱苷基本提取完全。

[参考文献]

[1] 韩军涛. 顽痹清丸的质量标准研究[J]. 中医正骨, 2005,17(11):17.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:320

[3] 李娜,买尔丹·马合木提. 新疆紫草提取物凝胶剂的制备及质量考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):14.

[4] 宋亚芳,张启伟,龚慕辛,等. 吴茱萸化学成分分析方法研究概述[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(4):82.

[5] 王傲雪,葛广波,齐晓怡,等. 中药复方茯苓汤有效成分的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):120.

[6] 秦泗莲,马利华,贾晓斌,等. 桂枝茯苓方物质基础及其质量控制模式研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):270.

[7] 凌科,张建民,徐萧槿,等. HPLC 测定宁心安神颗粒中马钱苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):76.

[8] 牛晓静,施钧翰. HPLC 同时测定安渴胶囊中马钱苷和葛根素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):90.

[9] 王裴芳,谢丽,许宝海. 六味地黄颗粒中马钱苷含量测定的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):52.

[10] 张乐,李兴华,马小亚,等. 山茱萸纳米软胶囊的制备及含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):30.

[责任编辑 顾雪竹]